

生防枯草芽孢杆菌高效抗逆菌株选育及其对一品红灰霉病的防控效果

李娜, 刘锦霞, 杜文静, 李晶, 丁品, 张建军

(甘肃省科学院 生物研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘要:采用 UV 和 NTG 复合诱变的方法对原始生防枯草芽孢杆菌 Bs-a 进行了诱变选育; 同时结合抗逆能力和室内外抑菌活性测定, 以期筛选出抑菌活性和抗逆性均较强的优良灰霉菌生防菌株。结果表明: 通过 UV 和 NTG 复合诱变的方法获得了枯草芽孢杆菌 Bs-a 的突变菌株 D17 和 W03, 2 种菌株具有传代稳定、高毒力、强抗逆的特点, 其抗紫外线能力极强, 经过 2.0 h 的紫外照射活菌浓度仍可达 10^8 cfu/mL 以上; 可耐受的温度和 pH 值范围分别为 $0\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、pH $3\sim 9$, 温室对一品红灰霉病的相对防效可达 85% 以上, 与出发菌 Bs-a 之间存在极显著差异, 是 2 株具备产业化开发价值的灰霉病生防菌株。

关键词:枯草芽孢杆菌; 高毒力; 抗逆性; 菌种选育; 灰霉病; 一品红

中图分类号:S 685. 23; S 476 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2014)23-0101-05

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn) 是一种嗜温、好氧、产芽孢的杆状细菌, 其生理特征多样, 分布广泛, 易分离培养, 比较容易在土壤和植物表面定殖、产生抗生素、分泌刺激植物生长的激素, 并能诱导寄主产生抗病性, 是一种理想的微生物杀菌剂^[1-2]。目前在水果、蔬菜、粮食等多种农作物病害上显示出较好的防治效果^[3-5]。近年来, 科学家们从枯草芽孢杆菌产生拮抗物质的类型、分子作用机理及应用效果等方面开展了广泛而深入的研究^[6-8], 但关于其菌株本身的抗性研究报道尚少, 生防枯草芽孢杆菌要实现产业化, 必须将其制剂化才有可能在田间成功应用, 所以根据生防微生物各制剂加工工艺及其在应用环境中存活、定殖与繁殖过程中对活性菌株的抗逆性和基础毒力要求^[9], 应该对枯草芽孢杆菌进行抗逆性和高毒力菌株选育, 以期获得最佳的预生产菌株。

灰霉病是由灰葡萄孢(*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.) 引起的植物重要病害之一, 特别是保护地蔬菜、花卉和

瓜果, 常年为害, 防治较困难, 在世界范围内均有相关报道^[10-11]。该病菌的寄主多达 230 余种, 可侵染多种植物, 对观赏花卉一品红的茎、叶、花和根均可侵染, 常年为害, 尤其容易侵染嫩叶和花, 受害叶片和花朵上布满灰色霉状物, 而且传播速度极快、严重影响一品红的品质和价值, 一旦控制不好, 经济损失可达 60%~80%, 甚至 100%^[12-13]。目前生产应用的常规杀菌剂对灰霉病防治效果极不稳定, 由于长期使用, 病原菌已经逐渐产生了抗药性, 而且长期大量应用容易造成保护地生态失衡和环境污染^[14-15]。为此, 寻找高效环保的生防微生物菌株及其制剂的开发研究是现代农药工业和可持续农业健康发展必然要求。枯草芽孢杆菌 Bs-a 是实验室初步筛选的野生菌株, 试验证明其对灰霉菌有效, 但其抑菌活性、抗紫外线和耐酸碱能力均较弱, 适存温度范围较窄。现采用复合诱变的方法首先对原始菌株 Bs-a 进行诱变选育, 再结合抗紫外线能力、对温度和酸碱度的耐受能力、室内抑菌活性和小区防效试验, 筛选出抑菌活性和抗逆性均较强的优良灰霉菌生防菌株, 以期为进一步制剂和生产应用储备基础技术资料, 为灰霉病的有效防控提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 枯草芽孢杆菌 Bs-a 为该课题组采自多年生一品红根际土壤, 经理化试验结合扩增细菌 16S rDNA 测序鉴定为枯草芽孢杆菌; 灰霉病病原菌为该实验室从一品红病叶上分离获得。

第一作者简介:李娜(1984-), 女, 本科, 助理研究员, 研究方向为生防微生物资源研究及其产品开发。E-mail: sherry0605@sohu.com.

责任作者:刘锦霞(1974-), 女, 本科, 副研究员, 研究方向为生物农药资源及产品开发与植物病虫害的生物防治技术。E-mail: liujinx0168@163.com.

基金项目:全国科学院联盟合作研究资助项目; 陇原青年创新人才扶持计划资助项目。

收稿日期:2014-07-14

1.1.2 供试培养基 NYDA 培养基:牛肉膏 0.8 g、酵母膏 0.5 g、葡萄糖 1.0 g、琼脂粉 1.2 g、蒸馏水溶至 100 mL、pH 7;液体种子培养基:NYDA 培养液;发酵培养基:蛋白胨 5.0 g、酵母膏 0.5 g、葡萄糖 1.0 g、 Na_2HPO_4 1.1 g、蒸馏水定容至 100 mL、pH 7。

1.2 试验方法

1.2.1 枯草芽孢杆菌 Bs-a 的 UV 和 NTG 复合诱变选育处理 取两环活化好的枯草芽孢杆菌 Bs-a 斜面菌种接种于液体种子培养基中,30℃、200 r/min 恒温振荡培养 50 h,取其发酵液离心(6 000 r/min,20 min),收集细胞,用少量生理盐水稀释,带玻璃珠振荡 15 min(使细胞分散均匀),用 pH 7.0 的磷酸缓冲液将其稀释为浓度 10^8 个/mL 的悬浮液。取 60 mL 平均分装于 3 个小口试剂瓶中,3 瓶中分别加入浓度为 0.2 mg/mL 的亚硝基胍溶液 10、20、30 mL,均于 30℃、150 r/min 振荡 60 min,将各处理液离心(4 000 r/min,20 min)后用 10 mL 无菌水洗涤 2 次,再用生理盐水调节菌液浓度为 10^8 个/mL。将上述每个处理液各取 3 份,每份 5 mL 置于直径 75 cm 无盖培养皿中,用紫外线(15 W,20 cm)分别处理 0.5、1.0、2.0 h,完成后每处理液分别按 10^2 、 10^4 、 10^6 倍无菌水稀释,每个浓度梯度各取 100 μL 均匀涂布于 NYDA 平板上,3 次重复,30℃恒温培养 24 h。从存活最少的平板上挑取规整,表面光滑,直径较大,颜色正常的单菌落转接于 NYDA 平板。用同样的方法再挑选 1 次,将符合要求的单菌落编号后再用发酵培养基将其培养(30℃、200 r/min)50 h,用抑菌圈法^[16]测定各诱变菌株对灰霉病原菌的抑菌活性,以未经紫外线处理的菌悬液作对照。初步筛选的高毒力菌株在 NYDA 培养基上继代培养 10 代以上并比较其发酵液和离心上清液的抑菌活性,选出传代稳定、抑菌活性高的突变菌株。

1.2.2 各优选诱变菌株的抗性筛选 1)各优选诱变菌株的抗紫外线能力:取各菌株发酵液 2 mL 于无菌培养皿(无皿盖)中,每菌株各取 3 份,分别用紫外线(15 W,20 cm)处理 30、60、120 min 后,用平板稀释的方法将各处理液以 100 倍稀释 3~4 个浓度梯度,每个浓度各取 300 μL 平均涂 3 个平板,30℃恒温培养 24 h 后数菌落数,以未经处理的发酵液为对照,对比并观察菌落形态,计算各处理液单位体积的活菌量。2)各优选诱变菌株对温度的耐受能力:取各菌株发酵液 2 mL 于无菌的 Eppendorf 管中,密封。每菌株各取 7 份,分别在 0、10、20、40、50、60、80℃恒温处理 2 h,其余方法同 1)。3)各优选诱变菌株对酸碱度的耐受能力:取各菌株发酵液 2 mL 于无菌的 5 mL Eppendorf 管中,每个菌株各取 5 份,分别用 1 mol/L 稀盐酸或 1 mol/L 氢氧化钠溶液调其 pH 为 3、5、7、9、11 后,密封,常温下放置 72 h。其余方法同 1)。4)各优选诱变菌株发酵液对温室内灰霉

病的防治效果:处理液为各优选诱变菌株发酵液原液及其 10、100、1 000 倍稀释液。空白对照为清水。在栽培一品红的温室里,选取有灰霉病危害较重的 2 年生一品红植株平均分成 17 个试验小区,各小区之间加保护行,每小区 30 株一品红,随机取 15 株,每株选 6 片无灰霉病斑的叶片,记录叶片总面积并挂牌标记,然后,对一品红全株同时喷施试验药品和空白对照,以叶片滴水为度。施药后的前 2 d 遮阴、保湿,并于施药后第 7 天调查记录标记叶片染病情况、病斑面积及其有无药害。按抗菌试验分级标准^[17]计算病情指数及防治效果。计算公式为病情指数(%)= $\sum(\text{各级病叶数} \times \text{相对级数值}) / \text{调查总叶片数} \times 9 \times 100\%$;防治效果(%)=(空白对照区病情指数—处理区病情指数)/空白对照区病情指数 $\times 100\%$;田间小区防效试验在甘肃省科学院生物试验基地完成。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 21.0 软件进行处理和方差分析。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌 Bs-a 的 UV 和 NTG 复合诱变选育

UV 和 NTG 复合诱变处理共获得了 9 株菌落形态符合条件的突变菌株,由表 1 室内抑菌毒力测定结果可以看出,其对灰霉病原菌抑制活性均与原菌株 Bs-a 存在极显著差异($P=0.01$),其中诱变获得菌株 C14、D17、W03 和 Y23 的抑菌活性与其它获得菌株之间差异极显著,而且传代稳定,经 10 余代连续培养仍保持较高的拮抗活性,且其离心上清液的抑菌活性与其它菌株也存在极显著性差异($P=0.01$)。可以初步判断是较为理想的

表 1 枯草芽孢杆菌 Bs-a 的 UV 和 NTG 复合诱变试验结果

Table 1 Experimental result of *Bacillus subtilis* Bs-a composite mutation by UV and NTG

菌株 Strain	抑制圈直径 Diameter of inhibiting circle/mm			
	第 1 代 The first generation	第 5 代 The fifth generation	第 10 代 Tenth generation	第 10 代(上清液) Tenth generation (The supernatant of fermentation)
A6	16.37 c	16.30 c	15.00 c	6.60 d
C6	15.67 c	15.00 c	13.80 c	5.60 d
C14	34.18 a	25.50 b	23.73 b	12.40 c
D17	30.83 a	33.45 a	34.69 a	20.15 b
D18	15.23 c	14.50 c	11.00 c	6.00 d
W03	30.22 a	31.80 a	30.00 a	18.80 b
W10	17.73 bc	15.50 c	13.55 c	5.53 d
N12	18.00 b	16.57 c	15.03 c	7.00 cd
Y23	37.50 a	37.50 a	36.50 a	8.30 c
Bs-a	6.50 d	6.50 d	7.00 d	5.57 d

注:同行或同列数据后的小写字母,相同者表示差异不显著,不同者表示差异显著, $P=0.01$ 。

Note:Peers or with the lowercase letters after the column data, same letters show the difference was not significant, different letters show significant difference, at 0.01 level.

抑菌突变菌株,进一步实施抗性试验。

2.2 各优选诱变菌株的抗逆性研究结果

2.2.1 抗紫外线的能力 该试验通过对各优选诱变菌株经过不同时间的紫外照射处理,其活菌浓度变化来考察它们的抗紫外线能力。由表 2 可以看出,菌株 W03 和 D17 对紫外线的抗性最强,经过 120 min 的紫外照射活菌量降低幅度较小,仍可达 10^8 cfu/mL 以上。这可能是 C14 和 D17 菌株除了本身对紫外线不敏感之外,在经过 50 h 的发酵培养芽孢生成较多,因为芽孢对紫外的敏感性要比菌体弱得多。菌株 C14 和 Y23 对紫外线的抗性较弱,尤其菌株 C14 在经过 120 min 紫外处理后活菌浓度降低非常显著,为 10^4 cfu/mL,已经不具备抑菌能力。

2.2.2 各优选诱变菌株对温度的耐受能力 生防菌株本身对温度的强耐受能力是其成功应用的前提,但不同的生防菌株对温度的耐受范围有显著的差异,从表 3 可以看出,各试验菌株发酵液在经不同温度处理 2 h 后的

表 3 各优选诱变菌株发酵液在不同温度处理 2 h 后的活菌浓度

Table 3 The concentration of bacteria of optimization fermentation broth of mutant strain through two hours different temperature processing

处理	活菌浓度 The concentration of bacteria/(cfu · mL ⁻¹)							
Treatment	0℃	10℃	20℃	30℃(CK)	40℃	50℃	60℃	80℃
W03	3.0×10^7	1.88×10^{10}	5.50×10^{10}	6.88×10^{10}	5.15×10^{10}	2.50×10^9	3.77×10^7	0
C14	2.0×10^4	3.83×10^7	6.25×10^9	6.75×10^9	3.36×10^7	1.01×10^6	0	0
D17	1.3×10^8	1.08×10^{10}	6.85×10^{10}	1.65×10^{11}	8.30×10^{10}	1.33×10^9	3.01×10^8	0
Y23	4.0×10^7	1.99×10^{10}	7.55×10^{10}	1.81×10^{11}	6.69×10^{10}	3.20×10^8	1.10×10^7	0

2.2.3 各优选诱变菌株的耐酸、耐碱能力 表 4 结果显示,突变菌株 Y23 耐酸耐碱能力最强,在 pH 3~11 的环境存放 2 h 之间均有存活,尤其在 pH 3~9 的环境中其活性虽有损失,但发酵液活菌浓度仍在 10^8 cfu/mL 以上,并不影响其抑菌活性。菌株 W03 和 D17 的耐酸耐碱能力也较强,经 pH 3~9 的环境处理仍具备较强的抑菌能力,但菌株 C14 的耐酸碱能力相对较差,在 pH 值小于 5 或大于 9 时活性均有较大损失,有效含菌量还不足 10^5 cfu/mL,抑菌活性受到严重限制,进一步制剂较为困难。

表 4 各优选诱变菌株发酵液在不同 pH 值处理后的活菌浓度

Table 4 The concentration of bacteria of optimization fermentation broth of mutant strain through different pH value processing

处理	活菌浓度 The concentration of bacteria/(cfu · mL ⁻¹)				
Treatment	pH 3	pH 5	pH 7(CK)	pH 9	pH 11
W03	1.45×10^6	3.75×10^{10}	6.88×10^{10}	3.33×10^{10}	0
C14	3.85×10^3	4.23×10^6	6.75×10^9	5.07×10^4	0
D17	3.50×10^7	5.88×10^{10}	1.65×10^{11}	5.50×10^{10}	0
Y23	8.45×10^8	4.10×10^{10}	1.81×10^{11}	1.93×10^{10}	2.40×10^2

2.3 各优选诱变菌株发酵液对一品红灰霉病的小区防治效果

由表 5 可知,菌株 W03 和 D17 发酵液对灰霉病的防效较好,防治效果最高可达 85% 以上,稀释 100 倍后

活菌浓度变化都较大,在 80℃ 处理 2 h 后,其活性尽失。但在 0~60℃ 之间,除菌株 C14 外,菌株 W03、D17 和 Y23 发酵液活菌浓度虽然都不同程度地降低了 2~3 个数量级,但最低浓度均仍可达 10^7 cfu/mL 以上,符合该类菌种的病害防治要求,所以在制剂或储存过程中温度在 0~60℃ 之间变化对这些生防菌株产品活性成分的影响不大。

表 2 各优选诱变菌株发酵液经紫外线处理不同时间后的活菌浓度

Table 2 The concentration of live bacteria of optimization fermentation broth of mutant strain through different time UV treatment

菌株	活菌浓度 The concentration of bacteria/(cfu · mL ⁻¹)			
Strain	CK	30 min	60 min	120 min
W03	6.88×10^{10}	6.00×10^{10}	5.67×10^9	1.50×10^8
C14	6.75×10^9	3.67×10^7	3.00×10^6	4.50×10^4
D17	1.65×10^{11}	1.33×10^{11}	1.09×10^{10}	2.35×10^9
Y23	1.81×10^{11}	2.40×10^{10}	1.35×10^8	7.01×10^3

表 5 各优选诱变菌株发酵液对温室内一品红灰霉病的防治效果

Table 5 Bioassay results of optimization fermentation broth of mutant strain and its control effect to *Botrytis cinerea* in greenhouse

菌株	稀释倍数	病情指数	防治效果
Strain	Diluent multiple	Disease index/%	Control efficiency/%
W03	原液 fermentation broth	4.91	84.11 a
	10 ¹ 倍 10 ¹ times	5.35	82.69 a
	10 ² 倍 10 ² times	6.11	80.26 a
	10 ³ 倍 10 ³ times	12.90	58.18 c
C14	原液 fermentation broth	11.47	62.91 c
	10 ¹ 倍 10 ¹ times	13.21	56.52 c
	10 ² 倍 10 ² times	17.90	41.09 e
	10 ³ 倍 10 ³ times	18.84	38.00 e
D17	原液 fermentation broth	4.54	85.07 a
	10 ¹ 倍 10 ¹ times	4.87	84.25 a
	10 ² 倍 10 ² times	5.87	81.03 a
	10 ³ 倍 10 ³ times	11.25	63.64 cd
Y23	原液 fermentation broth	11.77	61.95 d
	10 ¹ 倍 10 ¹ times	14.35	53.61 d
	10 ² 倍 10 ² times	17.67	42.86 e
	10 ³ 倍 10 ³ times	18.84	39.09 e

注:同列数据后的小写字母,相同者表示差异不显著,不同者表示差异显著, $P=0.05$ 。

Note: The lowercase letters after the column data, same letters show the difference was not significant, different letters show significant difference at 0.05 level.

防治效果仍在 80% 以上,进一步研究开发的价值较高。而菌株 Y23 对灰霉病的小区防效最高为 61.95%,与菌株 W03 和 D17 均存在极显著性差异($P=0.05$),这与其室内生测结果不一致,可能由于其本身的抗逆能力较差(2.2 证明其对紫外线和温度的耐受力均较弱),对各种环境因素较为敏感造成的。菌株 C14 发酵液小区试验中抑菌效果较差,防治效果最高为 62.10%,与菌株 W03 和 D17 存在极显著差异,加之其本身生长活性和抗逆性都相对较弱,进一步研究开发价值不高。

3 结论与讨论

诱变育种具有方法简单、育种速度快、可以在短期内使微生物某些特性得到大幅度的改良,并可不断满足生产发展所提出的新要求,是目前被广泛使用的主要育种方法之一^[18-19]。该项目通过 UV 和 NTG 复合诱变的方法获得枯草芽孢杆菌 Bs-a 的突变菌株 D17、C14、W03 和 Y23,其对灰霉病原菌的生物活性较强,室内测得其抑菌活性比原菌株均提高了 150% 以上,而且其离心上清液的抑菌效果也比较显著,这说明原始菌株 Bs-a 经 UV 和 NTG 复合诱变的方法可以获得高活性的突变菌株,而且突变菌株能产生抑菌作用较强的代谢产物。

阳光中的紫外线对微生物农药的影响比较大,是造成各种微生物杀虫剂、杀菌剂和除草剂在田间应用迅速失效的主要原因之一^[20],所以筛选对紫外线抗性较强的优良菌株,是各种生防微生物进一步开发应用的基础。另外,微生物菌种作为农药应用的前提是制剂化,在将这些生防微生物菌株的活体或代谢产物做成制剂的过程中,必然要经过一些冷、热、酸性或碱性等极端环境的处理,而且产品在储存和应用的过程中也要经受温差变化的影响^[21]。因此要求被制剂化的各试验菌株必须要有较强的抗逆境能力。该研究结果显示,复合理化诱变获得菌株 D17 和 W03 的抗紫外线和耐酸碱能力都很强,经过 120 min 的近距离紫外照射活菌浓度仍可达 10^8 cfu/mL 以上。可耐受的温度和 pH 值范围分别为 0~60℃、pH 3~9,抗逆境能力很强,符合制剂要求。各生防菌株发酵液作为生物农药的主药,其室内生物测定是优良菌株筛选的首要步骤,而小区试验是为了更准确地验证其抑菌毒性,是各种生防微生物进一步工业化生产和大面积推广应用的必要前提^[22]。试验结果显示,菌株 D17 和 W03 对一品红灰霉病的防效可达 85% 左右,是 2 株具备产业化开发价值的生防杀菌微生物菌株,为进一步深入研究其对灰霉菌的抑菌机理、在不同植株及土壤中的定殖能力、对其它病原菌的抑制效果以及制剂开发奠定了有利的基础和依据。

(该文作者还有武建荣,单位同第一作者。)

参考文献

- [1] Xu J, Chen S W, Yu Z N. Optimization of process parameters for poly-γ-glutamate production under solid state fermentation from *Bacillus subtilis* CCTCC202048[J]. Process Biochemistry, 2005(40):3075-3081.
- [2] 彭研,陈相艳,裴纪莹,等.生防芽孢杆菌的研究进展[J].山东农业科学,2013,45(7):138-140.
- [3] 杨佐忠,叶建仁.枯草芽孢杆菌 PRS5 菌剂控制水果贮藏期病害的研究[J].南京林业大学学报(自然科学版),2006,30(1):89-92.
- [4] 穆常青,潘玮,蒋细良,等.枯草芽孢杆菌对稻瘟病的防治效果评价及机制初探[J].中国生物防治,2006,22(2):158-160.
- [5] Chen Z, Li Q, Liu H, et al. Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85:1353-1360.
- [6] 黄现青,陆兆新,崔保安,等.枯草芽孢杆菌 fmbJ 产生的新型抗微生物物质体外抗 NDV 和 IBV 的活性分析[J].生物工程学报,2006,22(2):328-333.
- [7] Moyne A L, Cleveland T E, Tuzun S. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. FEMS[J]. Microbiology Letters, 2004, 234:43-49.
- [8] 孔建,赵白鸽,王文夕,等.枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* (Cohen)) B-903 菌株抗菌物质对植物病原真菌的抑制作用[J].植物病理学报,1999,25(1):69-72.
- [9] 孙广宇,宗兆锋.植物病理学实验技术[M].北京:中国农业出版社,2002:143-145.
- [10] Zhang C Q, Yuan S k, Sun H Y, et al. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouse to boscalid [J]. Plant Pathology, 2007, 56:646-653.
- [11] 阳征助.花卉灰霉病的发病症状与综合防治[J].现代农业科技,2007(7):50-51.
- [12] 张建军.灰葡萄孢对腐霉利的抗性变异及抗性菌株自然适合度研究[D].扬州:扬州大学,2004.
- [13] 李斌.一品红叶斑病病原学及其拮抗细菌的研究[D].杭州:浙江大学,2005.
- [14] 王万磊.城市园林植物病虫害生态控制探析[J].防护林科技,2014,126(3):48-49.
- [15] 夏文胜.武汉市园林植物病虫害可持续控制的对策[J].园林科技,2009(3):10-17.
- [16] 沈普良.农药生物测定[M].北京:中国农业出版社,2013:87-88.
- [17] 农业部农药检定所生测室.农药田间药效试验准则[S].北京:中国标准出版社,2000:190-193.
- [18] 梁亮,邱雁临,许进涛.紫外线与亚硝酸钠复合诱变选育 L 组氨酸产生菌[J].微生物学杂志,2008,28(2):27-29.
- [19] 陈永浩,王强.透明质酸生产菌的诱变选育[J].微生物学通报,2009,36(2):205-210.
- [20] 邱思鑫,黄志鹏,黄必旺,等.添加剂对苏云金杆菌杀虫效果的影响[J].武夷科学,2004,20(12):62-66.
- [21] 周赅,王中康,喻子牛.微生物农药研发与应用[M].北京:化学工业出版社,2006:159-166.
- [22] 曹堃程.农药大田药效试验及市场开发[M]//陈万义,王根龙,李钟华.新农药的研发-方法·进展.北京:化学工业出版社,2007:166-186.

低温对采后嫩南瓜贮藏过程中生理特性的影响

史君彦, 王 清, 王 倩, 高 丽 朴

(北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 果蔬农产品保鲜与加工北京市重点实验室, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 农业部都市农业(北方)重点实验室, 北京 100097)

摘 要:以“密本”鲜嫩南瓜为试材,研究了 3、5、7、9、11℃低温贮藏对鲜嫩南瓜生理特性的影响。结果表明:鲜嫩南瓜在 3、5、7、9℃低温下贮藏均有冷害发生,贮藏期间冷害指数、失重、细胞膜透性、黄色素及 MDA 含量均逐渐升高;叶绿素、可溶性蛋白质含量逐渐下降;11℃下贮藏未有冷害发生,生理活动受到明显的抑制,有效维持了鲜嫩南瓜的营养品质。

关键词:嫩南瓜;贮藏期间;冷害;生理特征

中图分类号:S 642.109⁺.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)23-0105-04

南瓜(*Cucurbita moschata*)是人们生活中最常见的蔬菜之一,富含淀粉、蛋白质、胡萝卜素、维生素 C 和氨基酸等营养成分^[1-3],不仅具有较高的食用价值,而且还被证明具有多种药理活性成分,是开发各种保健食品和药品的宝贵资源^[4],具有不可忽视的食疗作用,倍受喜爱。鲜嫩南瓜不仅具有成熟南瓜的营养成分和药理作用,而且还可作菜用,具有其独特的价值,市场需求也在

不断扩大,鲜嫩南瓜的运输及贮藏保鲜也日益受到关注。但鲜嫩南瓜在低温下贮藏易发生冷害,导致营养流失、果实腐烂变质^[5],国内外对鲜嫩南瓜低温贮藏的研究尚少。该试验研究了不同温度条件下鲜嫩南瓜的贮藏安全时间,并进一步研究了不同温度下贮藏鲜嫩南瓜的生理生化特性的变化,以期对鲜嫩南瓜的贮藏保鲜提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

鲜嫩南瓜品种“密本”产于北京市郊区,挑选无病虫害、无机械伤、完整、大小均一、成熟度基本一致的为试材。丙酮(北京化工厂),三氯乙酸(Sigma 公司);硫代巴比妥酸(Sigma 公司);其它试剂均为分析纯。仪器设备:KOITO-PCLH 冷库(日本);UV-1800 分光光度计(岛津);EC215 电导率仪(HANNA);SANYO -80℃冰箱

第一作者简介:史君彦(1988-),女,山东潍坊人,科研助理,研究方向为农产品贮藏保鲜。E-mail:shijunyan0130@126.com.

责任作者:高丽朴(1954-),女,研究员,研究方向为农产品贮藏保鲜与加工。E-mail:gaolipu@nercv.org.

基金项目:农业部公益性行业(农业)科研专项资助项目(201203095);国家大宗蔬菜产业体系建设资助项目(CARS-25-E-01);北京市农林科学院创新基金资助项目(cxjj201304)。

收稿日期:2014-09-15

Mutagenesis of *Bacillus subtilis* with High Toxicity and Strong Resilience, and Its Effect of Control of *Botrytis cinerea* of 'Poinsettia'

LI Na, LIU Jin-xia, DU Wen-jing, LI Jing, DING Pin, ZHANG Jian-jun, WU Jian-rong
(Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract: Taking the mutagenesis of *Bacillus subtilis* Bs-a by UV and NTG combined with the test of resilience and indoor and outdoor antibacterial activity, filter out two superior strains of bacteria D17 and W03, which had stable inheritance high toxicity, strong resilience. The results showed that the anti-UV ability of the bacterias were strong, the living bacteria concentration of which remained viable up to 10⁸ cfu/mL or more after ultra-violet radiation for 2 hours. The range of withstand temperature and pH were 0-60℃ and pH 3-9, Their control effect of *Botrytis cinerea* of "Poinsettia" were more than 85%. It was significantly different with original strain Bs-a. D17 and W03 were industrial development valuable in microbial biocontrol bacteria.

Keywords: *Bacillus subtilis*; high toxicity; resilience; breeding; *Botrytis cinerea* Pers.; 'Poinsettia'